

Accession Nbr :

2004-365163 [34]

Sec. Acc. CPI :

C2004-137898

Sec. Acc. Non-CPI :

N2004-292071

Title :

Determining activity of enzymes in non-mevalonate isoprenoid pathway, for screening for microbicides and herbicides, involves incubation with a substrate and electron-transfer agent

Derwent Classes :

B04 C07 D16 S03

Patent Assignee :

(BIOA-) BIOAGENCY AG

Inventor(s) :

ALTINCICEK B; HINTZ M; JOMAA H; KOLLAS A; SANDERBRAND S;
WIESNER J

Nbr of Patents :

3

Nbr of Countries :

105

Patent Number :

WO200435810 A2 20040429 DW2004-34 C12Q-001/00 Ger 16p *

AP: 2003 WO-EP10900 20031002

DSNW: AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH CN CO
CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL
IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK
MN MW MX MZ NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK
SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YU ZA ZM ZW
DSRW: AT BE BG CH CY CZ DE DK EA EE ES FI FR GB GH GM GR
HU IE IT KE LS LU MC MW MZ NL OA PT RO SD SE SI SK SL SZ TR
TZ UG ZM ZW

DE10247478 A1 20040624 DW2004-41 C12Q-001/25

AP: 2002DE-1047478 20021011

AU2003283256 A1 20040504 DW2004-67 C12Q-001/00

FD: Based on WO200435810

AP: 2003AU-0283256 20031002

This Page Blank (uspto)

Priority Details :

2002DE-1047478 20021011

IPC s :

C12Q-001/00 C12Q-001/25

Abstract :

WO200435810 A

NOVELTY - Simultaneous or separate determination of the activities of the enzymes GcpE and LytB comprises using an electron-transfer compound (I) and 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclo-diphosphate (II) or 4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl pyrophosphate (III).

DETAILED DESCRIPTION - An INDEPENDENT CLAIM is also included for a kit for performing the new method.

ACTIVITY - Antibacterial; Parasiticide; Herbicide. No details of tests for these activities are given.

MECHANISM OF ACTION - Inhibiting enzymes in the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis.

USE - The method is used to identify inhibitors of the enzymes, particularly compounds with antibacterial, antiparasitic and herbicidal activities, especially in a high throughput screen.

ADVANTAGE - Inhibitors of GcpE and LytB are expected to have low toxicity in humans and animals (which do not use the non-mevalonate pathway). Simultaneous testing of both enzymes should allow identification of synergistic mixtures of active agents. (Dwg.0/3)

Manual Codes :

CPI: B04-L01 B04-L03D B11-C07B2 B11-C08A B11-C08D2 B11-C08E3
B11-C10A B12-K04E B14-A01 B14-B02 B14-D03 C04-L01 C04-L03D
C11-C07B2 C11-C08A C11-C08D2 C11-C08E3 C11-C10 C11-C10A C12-
K04E C14-A01 C14-B02 C14-D03 C14-V01 D05-H09

EPI: S03-E09C5 S03-E10A S03-E14A1

Update Basic :

2004-34

Update Basic (Monthly) :

2004-05

Update Equivalents :

2004-41; 2004-67

Update Equivalents (Monthly) :

2004-06; 2004-10

This Page Blank (uspto)

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. April 2004 (29.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/035810 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷:

C12Q 1/00

(74) Anwalt: BULLING, Alexander; Dreiss, Fühlendorf,
Steimle & Becker, Postfach 10 37 62, 70032 Stuttgart
(DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/010900

(22) Internationales Anmeldedatum:

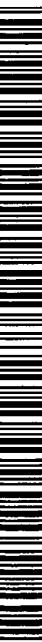
2. Oktober 2003 (02.10.2003)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(30) Angaben zur Priorität:

102 47 478.8 11. Oktober 2002 (11.10.2002) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).



(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BIOAGENCY AG [DE/DE]; Schnackenburgallee 116a, 22525 Hamburg (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 2004/035810 A2

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING ENZYMATIC ACTIVITY OF PROTEINS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER ENZYMATISCHEN AKTIVITÄT VON PROTEINEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for determining the enzymatic activity of GcpE and LytB proteins, in particular to the use of an electron carrier like dithionite, methyl viologen, benzyl viologen or an appropriated protein for measuring a substrate reaction by photometry. The inventive method is used for identifying the inhibitors of an enzymatic activity of the GcpE and LytB proteins in the form of antibacterial, antiparasitic agents and pesticides or in the form of conductivity structures for developing similar type active agents.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität des GcpE und des LytB-Proteins. Wesentlicher Bestandteil der Erfindung ist die Verwendung eines Elektronen-Überträgers wie z.B. Dithionit, Methylviologen, Benzylviologen oder eines geeigneten Proteins, wodurch die photometrische Messung des Substratumsatzes ermöglicht wird. Das Verfahren eignet sich zur Identifizierung von Inhibitoren für die enzymatische Aktivität des GcpE und LytB-Proteins, die sich als antibakteriellen, antiparasitären und herbiziden Wirkstoffe oder als

Verfahren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Proteinen

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Proteinen.

Die Biosynthese von Isoprenoiden über den klassischen Mevalonat-Weg ist seit längerem bekannt. Es konnte in jüngerer Zeit gezeigt werden, daß bei einigen Bakterien, Parasiten und in den Plastiden der Pflanzen die Isoprenoidsynthese über einen alternativen Weg, den sog. DOXP-Weg (Synonyme: MEP-Weg, Nicht-Mevalonat-Weg, Rohmer-Weg) erfolgt (Fig. 1). Die meisten Reaktionsschritte des DOXP-Wegs, die durch die Enzyme DOXP-Synthase (Dxs), DOXP-Reductoisomerase (Dxr), YgbP, YchB, und YgbB katalysiert werden, sind inzwischen gut erforscht. Darüber hinaus ist bekannt, daß die Enzyme GcpE und LytB an den späten Reaktionsschritten des DOXP-Wegs beteiligt sind. GcpE ist nach derzeitigen Erkenntnissen an der Umwandlung von 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclo-diphosphat (MEcPP) in 4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-pyrophosphat (HMBPP) beteiligt. LytB katalysiert die Umwandlung von HMBPP in Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) und Dimethylallyl-Pyrophosphat (DMAPP). Die publizierten Hinweise (s.u.) auf die Funktion von GcpE und LytB sind jedoch nur indirekt. Die enzymatische Aktivität dieser Enzyme konnte noch nie in einem in vitro-System mit genau bekannter Zusammensetzung demonstriert werden.

Die Enzyme des DOXP-Wegs stellen interessante Zielstrukturen für die Entwicklung neuer antimikrobieller und herbizider Wirkstoffe dar. Da der menschliche und tierische Organismus Isoprenoide nicht über den DOXP-Weg, sondern über den Mevalonat-Weg synthetisiert, ist von derartigen Wirkstoffen nur eine sehr geringe Toxizität zu erwarten. So konnte gezeigt werden, daß Fosmidomycin, ein Inhibitor der DOXP-Reductoisomerase, hochwirksam gegen bakterielle und parasitäre Infektionen ist. Klinische Daten über die Effizienz von Fosmidomycin zur Behandlung von Malaria und Urogenitaltrakt-Infektionen sind verfügbar. Außerdem ist Fosmidomycin als Herbizid wirksam. Dabei ist Fosmidomycin mit einer LD₅₀ > 11 g/kg p.o. in der Ratte extrem ungiftig.

Es ist davon auszugehen, daß Inhibitoren für weitere Enzyme des DOXP-Wegs vergleichbar vorteilhafte Eigenschaften für die pharmazeutische und agrochemische Anwendung bieten. Besonders durch die gleichzeitige Applikation von Inhibitoren für verschiedene Enzyme des DOXP-Wegs können Wirkstoffkombinationen mit synergistischer Wirkung erhalten werden. Derzeit sind nur Inhibitoren für die DOXP- Reductoisomerase beschrieben. Außerdem wurde Fluoropyruvat als schwacher Inhibitor der DOXP-Synthase identifiziert. Für die übrigen Enzyme des DOXP-Wegs existieren keine bekannten Inhibitoren. Deshalb besteht ein Bedarf nach geeigneten Testsystemen zur Auffindung derartiger Inhibitoren. Dafür ist es in notwen-

dig, die Aktivität der jeweiligen Enzyme in einer definierten Versuchsanordnung messen zu können.

Verschiedene Hinweise auf die Funktion von GcpE und LytB sind publiziert. So haben bioinformatische Ansätze ergeben, daß das gcpE und lytB-Gen nur bei solchen Organismen vor 5 kommt, die auch die Gene für die übrigen Enzyme des DOXP-Wegs besitzen. Erste experimentelle Hinweise auf die Funktion von LytB wurden mit Hilfe von Cyanobakterien der Gattung Synechocystis mit einer Mutation im Promotorbereich des lytB-Gens gewonnen. Die Zellen waren im Wachstum und der Pigmentproduktion beeinträchtigt (Cunningham et al.,

10 2000, J. Bacteriol. 182:5841-5848). Durch Zusatz von 3-Methyl-3-buten-1-ol und Methyl-2-buten-1-ol, den Alkohol-Derivaten der Isoprenoid-Vorläufermoleküle IPP und DMAPP, konnte der wildtypische Phänotyp rekonstituiert werden. Durch Überexpression des lytB- 15 Gens verschiedener Organismen in E. coli-Bakterien, die durch gentechnische Veränderungen zur Karotinoid-Synthese befähigt waren, wurde eine verstärkte Karotinoid-Produktion beobachtet.

Außerdem wurden E.coli-Mutanten konstruiert, bei denen das gcpE oder lytB-Gen deletiert wurde. Diese Zellen waren nur lebensfähig, wenn sie ein artifizielles Operon enthielten, das 20 die Synthese von Isoprenoiden über den Mevalonat-Weg ermöglichte (Altincicek et al., 2001, FEBS Lett. 499:37-40; Altincicek et al., 2001, J Bacteriol. 183:2411-6). Die Deletion des gcpE-Gens führte zu einer Akkumulation von MEcPP in den Bakterienzellen (Seemann et al., 2002, Tetrahedron Lett. 44:775-8). Analog wurde bei gcpE-Deletionsmutanten eine ca. 150-fache Anreicherung von HMBPP beobachtet (Hintz et al., 2001, FEBS Lett. 509:317-322).

Daraus wurde geschlossen, dass MEcPP das Substrat von GcpE und HMBPP das Substrat von 25 LytB darstellt.

Mit dem Ziel die Reaktionsprodukte der beiden Enzyme zu identifizieren, wurden E. coli-Bakterien konstruiert, die die Gene dxr, ygbP, ychB, ygbB und gcpE auf einem artifiziellen Operon überexprimierten (Hecht et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98:1483-42). Au-

30 ßerdem exprimierten diese Zellen das xylB-Gen über, dessen Genprodukt für die Phosphorylierung von 1-Desoxy-D-xylulose zu DOXP verantwortlich ist. Wenn dem Kulturmedium dieser Zellen ¹³C-markierte 1-Desoxy-D-xylulose zugesetzt wurde, konnte die Produktion von HMBPP durch NMR Spektroskopie nachgewiesen werden. Enthielt das Operon zusätzlich das lytB-Gen, wurde die Produktion von IPP und DMAPP nachgewiesen (Rohdich et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:1158-1163).

Die Produktion von HMBPP aus MEcPP konnte in Extrakten aus E. coli-Zellen, die das gcpE-Gen auf einem Expressionsplasmid enthielten, beobachtet werden (Seemann et al., 2002, Tetrahedron Lett. 43, 1413-15). Die Umsetzung von HMBPP in IPP und DMAPP

konnte analog in Extrakten aus *E. coli*-Zellen, die das *lytB*-Gen überexprimieren, gezeigt werden (Adam et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA Aug. 27, e-published ahead of print). Außerdem konnte eine verstärkte Umsetzung von HMBPP in IPP und DMAPP in *E. coli*-Zellextrakten oder Extrakten aus isolierten Chromoplasten des Roten Pfeffers gezeigt werden, wenn den Extrakten rekombinantes LytB-Protein zugesetzt wurde. Bei diesen Versuchen war die Umsetzung aber von unbekannte Faktoren, die aus den Zellextrakten stammten, abhängig.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Proteinen des DOXP-Wegs bereitzustellen. Dieses Verfahren soll ferner dazu genutzt werden, Substanzen mit antimikrobieller Wirkung oder herbizider Wirkung, jedoch geringen Nebenwirkungen für Mensch und Tier aufzufinden.

Überraschenderweise hat sich nun herausgestellt, daß sowohl die Aktivität des GcpE- als auch des LytB-Enzyms in einem definierten System gemessen werden kann, wenn eine Verbindung mit elektronenübertragenden Eigenschaften verwendet wird. Es wird also ein Verfahren zur gleichzeitigen oder getrennten Bestimmung der enzymatischen Aktivität eines Enzyms, ausgewählt aus GcpE und LytB, bereitgestellt, in dem das jeweilige Enzym, eine oder mehrere Verbindungen mit elektronenübertragenden Eigenschaften und mindestens eine Substanz, ausgewählt aus 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclo-diphosphat (MEcPP) und 4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-pyrophosphat (HMBPP) miteinander in Kontakt gebracht werden und der Umsatz oder die Konzentrationsänderung oder die Änderung des Oxidationszustands einer der beteiligten Verbindungen gemessen wird und daraus die Aktivität des Enzyms bestimmt wird. Als Verbindungen mit elektronenübertragenen Eigenschaften eignen sich besonders Dithionit, Titan(III)citrat, Methylviologen, Benzylviologen oder eine andere Verbindung ausgewählt aus der Gruppe, die aus Antrachinon; Antrochinon-2,6-disulfonat; Antrochinon-2-sulfonat; 2-Hydroxy-1,4-anthrachinon; 1,4-Benzochinon; Tetrachlorobenzochinon; 2,5-Dibromo-3-methyl-6-isopropylbenzochinon; 5-n-Undecyl-6-hydroxy-4,7-dioxobenzothiazol; 1,4-Naphtochinon; 1,4-Naphtochinon-2-sulfonat; 1,2-Naphtochinon; 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon; 5-Hydroxy-1,4-naphthochinon; Indigo; 5,5'-Indigodisulfonat; 5,5',7-Indigotrisulfonat; 5,5',7,7'-Indigotetrasulfonat; N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamin; 2,3,5,6-Tetramethyl-p-phenylenediamin; Phenazin; Phenazinethosulfat; Phenazinmethosulfat; N-Methylphenazoniummethosulfat; N-Methylphenazoniumsulfonatmethosulfat; N-Ethylphenazoniummethosulfat; N-Methyl-1-hydroxyphenazoniummethosulfat; Neutral-Rot; Phenol-Rot; Chlorphenol-Rot; Cresol-Rot; Bromcresol-Purpur; Methylen-Blau; Toluidin-Blau; Safranin; 2,6-Dichlorphenolindophenol; Durochinon; Pyocyanin; Ruthenium-Hexaminchlorid; Trimethylhydrochinon; Menadion; 5-Deaza-7,8-dimethyl-10-methylisoalloxazin; Difenoquat; Deiquat; photoreduziertes Deazaflavin besteht. Auch eignen sich weitere Verbindungen, durch die die Übertragung eines einzelnen Elektrons möglich ist, be-

sonders chinoide Verbindungen, die zur Ausbildung eines Hemichinons befähigt sind. Als Elektronenüberträger können auch geeignete Proteine verwendet werden. Besonders eignen sich Cytochrome, Flavodoxin, Flavodoxinreduktase, Ferredoxin, Ferredoxinreductase, Thioredoxin, Thioredoxinreductase, YfgB und Glutathionreductase. Auch ist die gleichzeitige 5 Verwendung einer der oben erwähnten Verbindungen und einem Protein mit elektronenübertragenden Eigenschaften möglich. Aufgrund des unterschiedlichen Absorptionsverhaltens des reduzierten und oxidierten Elektronenüberträgers kann der enzymatische Umsatz durch photometrische Messung kontinuierlich verfolgt werden. Grundsätzlich können auch mehrere der genannten Elektronenüberträger verwendet werden.

10 Die GcpE, bzw. LytB-Aktivität kann bei diesem Verfahren auch direkt durch Messung der Konzentrationsänderungen des umgesetzten Substrats (MEcPP, bzw. HMBPP) oder der gebildeten Produkte (HMBPP, bzw. IPP und DMAPP) bestimmt werden. Dazu eignen sich verschiedene chromatographische und spektroskopische Methoden wie HPLC, MS, LC-MS, GC, 15 GC-MS, NMR oder DC. Besonders geeignet sind NMR, HPLC und LC-MS. Prinzipiell kann die Aktivität auch über die Umkehrreaktion bestimmt werden. Auch ist es möglich, gekoppelte Testsysteme aufzubauen, bei denen ein oder mehrere weitere enzymatische oder chemische Reaktionen vor- oder nachgeschaltet sind. Insbesondere ist die gleichzeitige Aktivitätsbestimmung von GcpE und LytB möglich. Weiterhin kann der enzymatische Umsatz potentiometrisch oder photometrisch über die Absorption des Eisen-Schwefel-Clusters des LytB-Proteins gemessen werden.

20 Die Substrate MEcPP, bzw. HMBPP werden bevorzugt in einer Konzentration von 0,001 bis 10 mM eingesetzt, der Elektronenüberträger in einer Konzentration von 0,01 bis 10 mM. Die 25 verwendeten Substrate können chemisch oder enzymatisch synthetisiert oder aus Bakterien-, Pflanzen- oder Parasitenzellen, bevorzugt nach Deletion des gcpE-, bzw. des lytB-Gens, isoliert werden.

30 Die Überführung des Elektronenüberträgers in die reduzierte Form erfolgt z.B. durch Zusatz von geeigneten Reduktionsmitteln, wie z.B. Na-Dithionit oder Titan(III)citrat. Diese Reduktionsmittel können bereits allein zu einem Substratumsatz führen. Auch in diesem Fall kann Methylviologen, Benzylviologen oder eine weitere Verbindung, die sich als Redox-Indikator 35 eignet, verwendet werden, um den Ablauf der Reaktion photometrisch zu verfolgen. Prinzipiell kann die Reduktion des Elektronenüberträgers auch photochemisch, elektrochemisch oder enzymatisch erfolgen.

Die photometrische Messung des Umsatzes erfolgt bevorzugt in einem Wellenlängenbereich von 200 nm bis 800 nm, ganz bevorzugt bei 604 nm, 662 nm und 732 nm, wenn z.B. Methylviologen als Elektronenüberträger genutzt wird. Die Reaktion kann in verschiedenen kompa-

tiblen Puffersystemen erfolgen. Beispielsweise eignen sich als Puffer TRIS, HEPES, MOPS, PIPES, MES, Phosphat. Der bevorzugte pH-Bereich liegt zwischen 4,0 und 9,5. Außerdem können Salze wie NaCl, KCl, LiCl und MgCl₂ zugesetzt werden. Die Reaktion kann in Gegenwart verschiedener Kationen, vor allem Co²⁺, Mn²⁺, Fe₂⁺, Mg²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺, die beispielsweise als Chloride zugesetzt werden, erfolgen. Auch kann der Zusatz von Molybdän-, Wolfram- und Vanadium-Verbindungen günstig sein. Das System ist tolerant gegen hohe Varianzen in der Gesamtsalzkonzentration, vorzugsweise werden aber Konzentrationen zwischen 5 und 1000 mM verwendet. Es können auch Sulfhydryl-reaktive Reduktionsmittel wie DTT, 2-Mercaptoethanol, Glutathion und Cystein zugesetzt werden, vorzugsweise im Konzentrationsbereich zwischen 0,5 und 20 mM. Weiter mögliche Additiva sind NADH, NAD⁺, NADPH, NADP⁺, FAD, FADH₂, FMN, FMNH₂ und Tris(2-carboxyethyl)phosphin, bevorzugt in Konzentrationen von 0,01 bis 20 mM. Auch kann ein günstiger Effekt durch den Zusatz von unspezifischen Proteinen wie BSA oder Casein und Detergenzien wie Tween 20, Tween 80, CHAPS, NP-40 oder Triton X-100, bevorzugt in Konzentrationen zwischen 0,01 und 2 %, erreicht werden, besonders zur Überprüfung verschiedener potentieller Inhibitoren.

Das verwendete GcpE-, bzw. LytB-Protein kann rekombinant hergestellt oder aus verschiedenen Organismen aufgereinigt werden. Prinzipiell kann das Enzym aus jedem Organismus, der über den DOXP-Weg verfügt, stammen. Als besonders günstig hat sich die Verwendung von Proteinen aus thermophilen Organismen, vor allem Aquifex aeolicus, Thermus thermophilus, und Thermotoga maritima, erwiesen. In diesem Fall kann die Reaktion bei erhöhten Temperaturen zwischen 45 und 100 °C erfolgen. Weiterhin eignen sich besonders die Enzyme aus pathogenen Bakterien wie Mycobacterium tuberculosis, Helicobacter pylori, Escherichia coli und Haemophilus influenzae. Auch ist die Verwendung der Enzyme aus Pflanzen, insbesondere Arabidopsis thaliana, Menta piperita, und Solanum lycopersicum möglich. Auch können die Enzyme aus Parasiten des Stamms Apicomplexa, insbesondere dem Malaria-Erreger Plasmodium falciparum und dem Erreger der Toxoplasmose Toxoplasma gondii, stammen.

Es hat sich als besonders günstig erwiesen, die Enzyme vor oxidativer Schädigung zu schützen. Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, daß die Aufreinigung der Enzyme und die Durchführung des Aktivitätstests unter Sauerstoffausschluß erfolgt. Dies kann durch Arbeiten unter Schutzgas wie Stickstoff oder Argon erreicht werden. Es können entweder die verschiedenen verwendeten Gefäße und Apparaturen mit Schutzgas beschickt werden oder die Arbeiten in einem gasdichten mit Schutzgas gefluteten Zelt oder einer entsprechenden Kammer (sog. glove box) durchgeführt werden. Auch ist es möglich, das Eisen-Schwefel-Cluster der Enzyme zu rekonstituieren. Dies ist beispielsweise durch Inkubation mit Fe(NH₄)₂(SO₄)₂, FeCl₂ oder FeCl₃ oder andere zwei- oder dreiwertige Eisenverbindungen und einem Dithionit und/oder Sulfid und/oder einem oder mehreren Hilfsproteine wie z.B. dem Nifs-Protein möglich. Es kann dabei auch das Isotop Fe-57 verwendet werden.

- Der erfindungsgemäße LytB-Aktivitätstest kann zur Auffindung spezifischer Enzyminhibitoren genutzt werden. Dazu werden die zu testenden Substanzen dem Reaktionsansatz zugesetzt und ihr Einfluß auf die Umsatzrate gemessen. Die Substanzen werden typischerweise in verschiedenen Konzentrationen zwischen 1 nM und 0,2 mM getestet. Soll eine größere Anzahl von Substanzen ohne verfügbarer Information über ihre inhibitorischen Eigenschaften getestet werden, so werden sie in den meisten Fällen zunächst bei einer fixen Konzentration im Bereich von 0,005 bis 0,2 mM eingesetzt.
- 5
- 10 Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich zur Durchführung eines sog. „high-throughput screenings“ (HTS). Dadurch wird die Untersuchung einer großen Anzahl von potentiellen Inhibitoren (1.000 bis 1.000.000 Verbindungen) ermöglicht. Für die Durchführung des HTS eignen sich besonders Mikrotiterplatten, mit 96, 384 oder 1536 wells. Das bevorzugte Reaktionsvolumen beträgt in Abhängigkeit vom Plattenformat 0,5 bis 200 µl.
- 15
- Die mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems identifizierten Inhibitoren eignen sich als antibakterielle und antiparasitäre Wirkstoffe für die Behandlung von Mensch und Tier, sowie als Herbizide, bzw. als Leitstrukturen für die Entwicklung solcher Wirkstoffe.
- 20
- 25 Die für das erfindungsgemäße Verfahren benötigten Komponenten können als sog. „kit“ als Experimentalausstattung zur Verfügung gestellt und vermarktet werden. Ein solcher kit enthält beispielsweise fertige angesetzte Lösungen der zur Durchführung des Verfahrens nötigen Reagenzien oder Konzentrate zur Herstellung solcher Lösungen, außerdem spezielle Reaktionsgefäß, Geräte und Apparaturen sowie eine Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Assays.

Beispiel 1: Expressionsklonierung des gcpE-Gens

Es wurde ein Plasmid zur rekombinanten Darstellung des GcpE-Proteins aus *T. thermophilus* in *E. coli* konstruiert. Da die Expression der originalen DNA-Sequenz wegen des hohen G/C-Gehalts ineffizient ist, wurde ein vollständig synthetisches Gen im präferierten Codon-Gebrauch von *E. coli* hergestellt. Das synthetische Gen wurde über die Restriktionsschnittstellen Nco I und Bgl II in den Expressionsvektor pQE-60 ligiert. Die carboxyterminale Oligo-Histidin-Sequenz wurde durch Verdau des Plasmids mit Bbl II und Hind III, Auffüllen der überhängenden Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I und Religation mit T4-Ligase beseitigt.

Beispiel 2: Aufreinigung des rekombinanten GcpE-Proteins

4 Schüttelkolben mit je 400 ml TB (Terrific Broth)-Medium supplementiert mit 0,2 mg/ml Ampicillin und 0,05 mM FeCl₃ wurden mit je 10 ml aus einer Übernachtkultur von E. coli TOP10F'-Zellen, die mit dem oben beschriebenen Plasmid transformiert wurden waren, inkuliert. Die Kulturen wurden unter lebhaftem Schütteln für 12 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und auf Trockeneis eingefroren. Alle folgenden Schritte wurden unter Sauerstoffausschluß durchgeführt. Das Pellet wurde mit 80 ml Puffer A (20 mM Tris HCl, pH 8,0) mit 0,1 mg/ml DNase I versetzt, und die Zellen durch Ultraschallbehandlung disintegriert. Das Lysat wurde für 20 min bei 16.000 rpm zentrifugiert und der Überstand einer Hitzedenaturierung bei 65°C für 30 min unterworfen. Das präzipitierte Material wurde durch Zentrifugation bei 25.000 rpm für 25 min beseitigt und der Überstand über einen Filter mit 0,2 um Porendurchmesser filtriert. Die Lösung wurde auf eine 1,6 x 40 cm DEAE-Sepharose-Säule (Fast Flow, Pharmacia), die mit Puffer A äquilibriert wurden war, geladen. Die Säule wurde mit einem linearen Gradienten von 0 bis 1 M NaCl in Puffer A eluiert. Die Hauptfraktion wurde durch Gelfiltration (Sephadex G-25, PD10, Pharmacia) in Puffer A umgepuffert. Das Protein wurde weiter durch Anionenaustausch-Chromatographie gereinigt (1 x 10 cm, source 15 Q, Pharmacia; 0 bis 1 M NaCl in Puffer A). Die Hauptfraktion wurde durch Ultrafiltration auf 1,3 ml konzentriert (Centricon, Millipore, 30 kDa cut-off). Ein letzter Reinigungsschritt erfolgte durch Gelfiltration über eine XK 16/60 Superdex 75-Säule, die mit 100 mM NaCl in Puffer A äquilibriert und eluiert wurde. Die Proteinlösung wurde durch Ultrafiltration auf 25 mg/ml konzentriert und bei -80°C gelagert.

Beispiel 3: Durchführung des GcpE-Aktivitätstests

Die Umsetzung von MEcPP durch das GcpE-Protein wurde photometrisch gemessen. Alle Arbeiten wurden in einer sauerstofffreien Atmosphäre durchgeführt. Die Reaktion erfolgte bei 55 °C. In einer Quarzküvette wurden 0,7 ml einer Lösung von 2 mM Methylviologen in 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) vorgelegt. Das Methylviologen wurde durch Zusatz Na-Dithionit in seine reduzierte Form überführt, bis eine OD von 2,0 erreicht wurde. Dem Ansatz wurden das GcpE-Protein in unterschiedlichen Mengen zugesetzt und die Reaktion durch Zugabe von 1 mM MEcPP gestartet. Die einsetzende Abnahme der Absorption des reduzierten Methylviologens wurde bei einer Wellenlänge von 732 nm gemessen. In Fig. 2 ist die GcpE-abhängige zeitliche Abnahme der Absorption von reduziertem Methylviologen bei 732 nM in Gegenwart von MEcPP gezeigt.. Mit Hilfe der so erhaltenen Meßwerte wurde die Aktivität des GcpE-Proteins auf ca. 1 μmol min⁻¹ mg⁻¹ berechnet.

35

Beispiel 4: Expressionsklonierung des lytB-Gens

Durch PCR wurde unter Verwendung der Oligonukleotiden Aa-LytB-cHis-for (5'-
CCATGGTTGACATAATAATCGCA-3') und Aa-LytB-cHis-rev (5'-
AGATCTGGAGGAAACCAATTGCC-3') das lytB-Gen aus genomischer DNA von A.
aeolicus amplifiziert. Nach Zwischenklonierung des PCR-Produkts in den pCR-TOPO-T/A-

5 Vektor wurde die Insertion mit NcoI und BglII herausgelöst, gereinigt und in den mit NcoI und BglII vorbehandelten pQE60-Vektor ligiert. Das so erhaltene Konstrukt pQE60-Aa-LytB ermöglicht die Expression des LytB-Enzyms aus A. aeolicus mit einer carboxyterminalen His₆-Fusion.

10 Beispiel 5: Aufreinigung des rekombinanten LytB-Proteins

E. coli- TOP10F'- oder XL1Blue- Zellen mit einem geeigneten Hilfsplasmid zur Expression AT-reicher Sequenzen wurden mit dem Expressionsplasmid pQE60-Aa-LytB transformiert und in Standard I-Medium (Merck) mit 150 µg/ml Ampicillin und mit 25 µg/ml Chloramphenicol inkubiert. Die Induktion der Expression erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer OD_{600nm} von 0,8 mit 1 mM IPTG entweder bei 37°C für 4 Stunden oder bei 30°C über Nacht.

500 ml der induzierten Zellkultur wurden abzentrifugiert und in 50 ml entgastem Puffer A aufgenommen. Alle folgenden Schritte wurden in einer sauerstofffreien Atmosphäre durchgeführt. Die Zellen wurden durch Ultra-Schall disintegriert (Ultraschall Sonoplus HD70, Bandelin, Berlin, 70% Amplitude, 40% Puls-Pause-Verhältnis). Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 14.000 g und 4°C wurde die zytoplasmatische Fraktion für 30 min auf 65°C erhitzt und erneut 30 min bei 14.000 g und 4°C zentrifugiert. Die lösliche Protein-Fraktion wurde über einen Filter (Renner) mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm filtriert.

25 Das Filtrat wurde mit Hilfe einer Peristaltikpumpe bei einer Flußrate von 2 ml/min auf eine HR10/10-Säule mit ca. 8 ml Bettvolumen, die mit der Metall-Affinitäts-Matrix Talon Superflow (Clonetech) gefüllt worden war, geladen. Die Säule wurde dann in eine FPLC-Anlage transferiert und mit folgendem Stufengradient bei einem Fluß von 2 ml/min entwickelt: Waschen mit 80% Puffer A und 20% Puffer B für 25 min, Elution mit 100% Puffer B für 15 min.

30 Die Elution wurde durch UV-Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt, und die entsprechenden Fraktionen gesammelt.

35 Die Fraktionen, die das LytB-Protein enthielten, wurden schließlich über eine PD10-Säule (Amersham-Pharmacia) auf Puffer C umgepuffert. Bei Bedarf wurde die Proteinlösung durch Ultrafiltration aufkonzentriert. Das Protein zeigte eine auffällig dunkelbraune Färbung mit einem Absorptionsmaximum um 410 nm, das durch das vorhandene Eisen-Schwefel-Cluster Zustande kommt.

Puffer A: 30 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl

Puffer B: 30 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 100 mM Imidazol

Puffer C: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0)

Beispiel 6: Durchführung des Lyt-B Aktivitätstests

- 5 Die Umsetzung von HMBPP durch das LytB-Protein wurde photospektrometrisch analysiert. Alle Arbeiten wurden in einer Sauerstoff-freien Atmosphäre durchgeführt. Danbei wurde in einer Quarzküvette 0,6 ml einer Lösung von 0,1 mM Methylviologen in 20 mM Tris-HCl (pH 8) vorgelegt. Das Methylviologen wurde durch Zusatz von 0,08 mM Na-Dithionit in seine reduzierte Form überführt. Dem Ansatz wurden 10 µg LytB-Protein zugesetzt und die Reaktion 10 durch Zugabe von 0,1 mM oder 1 mM HMBPP gestartet. In einem Kontrollansatz wurde kein HMBPP zugesetzt. Die einsetzende Abnahme der Absorption des reduzierten Methylviologens wurde in einem Wellenlängenbereich von 300 bis 800 nm verfolgt. Dazu wurde in Abständen von 30 sec jeweils ein vollständiges Absorptionsspektrum aufgenommen. In Fig. 3 ist die LytB-abhängige zeitliche Abnahme der UV-VIS-Absorption von reduziertem Methylviologen bei unterschiedlichen HMBPP-Konzentrationen gezeigt. Der Extinktionskoeffizient 15 von Methylviologen liegt bei 604 nm bei $13,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, bei 662 nm bei $7,28 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ und bei 732 nm bei $3,15 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Patentansprüche

1. Verfahren zur gleichzeitigen oder getrennten Bestimmung der enzymatischen Aktivität
5 eines Enzyms, ausgewählt aus GcpE und LytB, dadurch gekennzeichnet, dass das jeweili-
ge Enzym, eine oder mehrere Verbindung mit elektronenübertragenden Eigenschaften und
mindestens eine Substanz, ausgewählt aus 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclo-diphosphat
(MEcPP) und 4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-pyrophosphat (HMBPP), verwendet wer-
den.

10

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verbindung mit elek-
tronenübertragenden Eigenschaften verwendet wird, die ausgewählt ist aus der Gruppe
Antrachinon; Antrochinon-2,6-disulfonat; Antrochinon-2-sulfonat; 2-Hydroxy-1,4-
anthrachinon; 1,4-Benzochinon; Tetrachlorobenzochinon; 2,5-Dibromo-3-methyl-6-
15 isopropylbenzochinon; 5-n-Undecyl-6-hydroxy-4,7-dioxobenzothiazol; 1,4-
Naphtochinon; 1,4-Naphtochinon-2-Sulfonat; 1,2-Naphtochinon; 2-Hydroxy-1,4-
naphthochinon; 5-Hydroxy-1,4-naphthochinon; Indigo; 5,5'-Indigodisulfonat; 5,5',7-
Indigotrisulfonat; 5,5',7,7'-Indigotetrasulfonat; N,N,N',N'-Tetramethyl-p-
phenylenediamin; 2,3,5,6-Tetramethyl-p-phenylenediamin; Phenazin; Phenazinethosulfat;
20 Phenazinmethosulfat; N-Methylphenazoniummethosulfat; N-
Methylphenazoniumsulfonatmethosulfat; N-Ethylphenazoniummethosulfat; N-Methyl-1-
hydroxyphenazoniummethosulfat; Neutral-Rot; Phenol-Rot; Chlorphenol-Rot; Cresol-
Rot; Bromcresol-Purpur; Methylen-Blau; Toluidin-Blau; Safranin; 2,6-Dichlor-phenol-
indophenol; Durochinon; Pyocyanin; Ruthenium-Hexaminchlorid; Trimethylhydrochinon;
25 Menadion; 5-Deaza-7,8-dimethyl-10-methyl-isoalloxazin; Difenoquat; Deiquat; photore-
duziertes Deazaflavin; Dithionit; Titan(III)citrat; Methylviologen; Benzylviologen.

30

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass Dithionit, Titan(III)citrat,
Methylviologen oder Benzylviologen verwendet wird.

35

4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Protein mit elektronen-
übertragenden Eigenschaften verwendet wird.

35

5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass ein Cytochrom, Flavodoxin,
Flavodoxinreduktase, Ferredoxin, Ferredoxinreductase, Thiredoxin, Thiredoxinreductase,
YfgB oder Glutathionreductase verwendet wird.

6. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivität von GcpE, oder
LytB über eine photometrische Messung bestimmt wird.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Absorptionsänderung einer der Verbindungen gemäß der Ansprüche 2 bis 5 gemessen wird.
- 5 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentrationsänderung von reduziertem Benzylviologen oder Methylviologen gemessen wird.
9. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentrationsänderung von Dithionit oder Titan(III)citrat gemessen wird.
- 10 10. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Absorptionsänderung des Eisen-Schwefel-Clusters, das als Co-Faktor des GcpE oder des LytB-Enzyms fungiert, gemessen wird.
- 15 11. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Absorptionsänderung eines Proteins mit elektronenübertragenden Eigenschaften gemessen wird.
12. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Konzentrationsänderung von 2-C-methyl-D-erythritol-2,4-cyclo-diphosphat (MEcPP), 4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-pyrophosphat (HMBPP), Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) oder Dimethylallyl-Pyrophosphat (DMAPP) gemessen wird.
- 20 13. Verfahren gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß für die Messung NMR-Spektroskopie, HPLC oder LC-MS verwendet wird.
- 25 14. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das GcpE- oder LytB-Protein aus Bakterien, Parasiten oder Pflanzen stammt.
15. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das GcpE- oder LytB-Protein aus einem thermophilen Organismus stammt.
- 30 16. Verfahren gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das GcpE- oder LytB-Protein aus Aquifex aeolicus, Thermotoga maritima oder Thermus thermophilus stammt.
- 35 17. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das GcpE- oder LytB-Protein aus Plasmodium falciparum stammt.
18. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das GcpE- oder LytB-Protein aus Arabidopsis thaliana, Menta piperita, oder Solanum lycopersicum stammt.

19. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das GcpE- oder LytB-Protein aus *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori*, *Escherichia coli* oder *Hemophilus influenzae* stammt.

5

20. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das GcpE- oder LytB-Protein durch rekombinante Expression gewonnen wird.

10 21. Verfahren gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß das Eisen-Schwefel-Cluster des GcpE- oder LytB-Proteins *in vitro* rekonstituiert wird.

22. Verfahren gemäß Anspruch 15 und 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion bei Temperaturen zwischen 45 und 100°C erfolgt.

15 23. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Reaktion unter anaeroben oder mikroaeroben Bedingungen erfolgt.

20 24. Verfahren nach einem der vorherigen Ansprüche zur Identifizierung von Inhibitoren der enzymatischen Aktivität des GcpE- oder LytB-Proteins, dadurch gekennzeichnet, daß potentiell die Aktivität des GcpE- oder des LytB-Proteins beeinträchtigende Substanzen dem reaktionsansatz zugesetzt werden und ihr Einfluß auf die Aktivität des Proteins bestimmt wird.

25 25. Verfahren nach Anspruch 24 zur Identifizierung von Substanzen mit antibakteriellen, antiparasitären und herbiziden Eigenschaften.

26. Verfahren gemäß Anspruch 24 und 25 zur Durchführung eines high-throughput screenings (HTS).

30 27. Experimentalaurüstung (kit) zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 26.

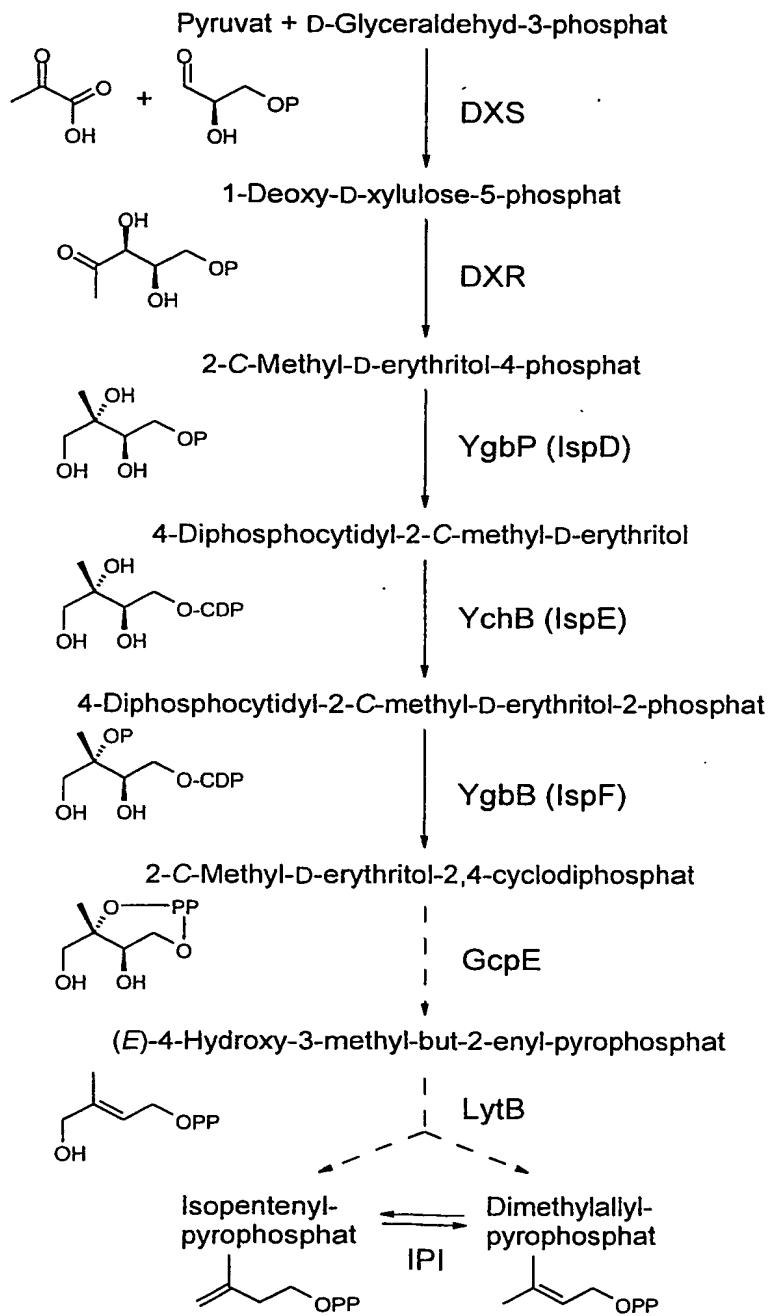


Fig. 1

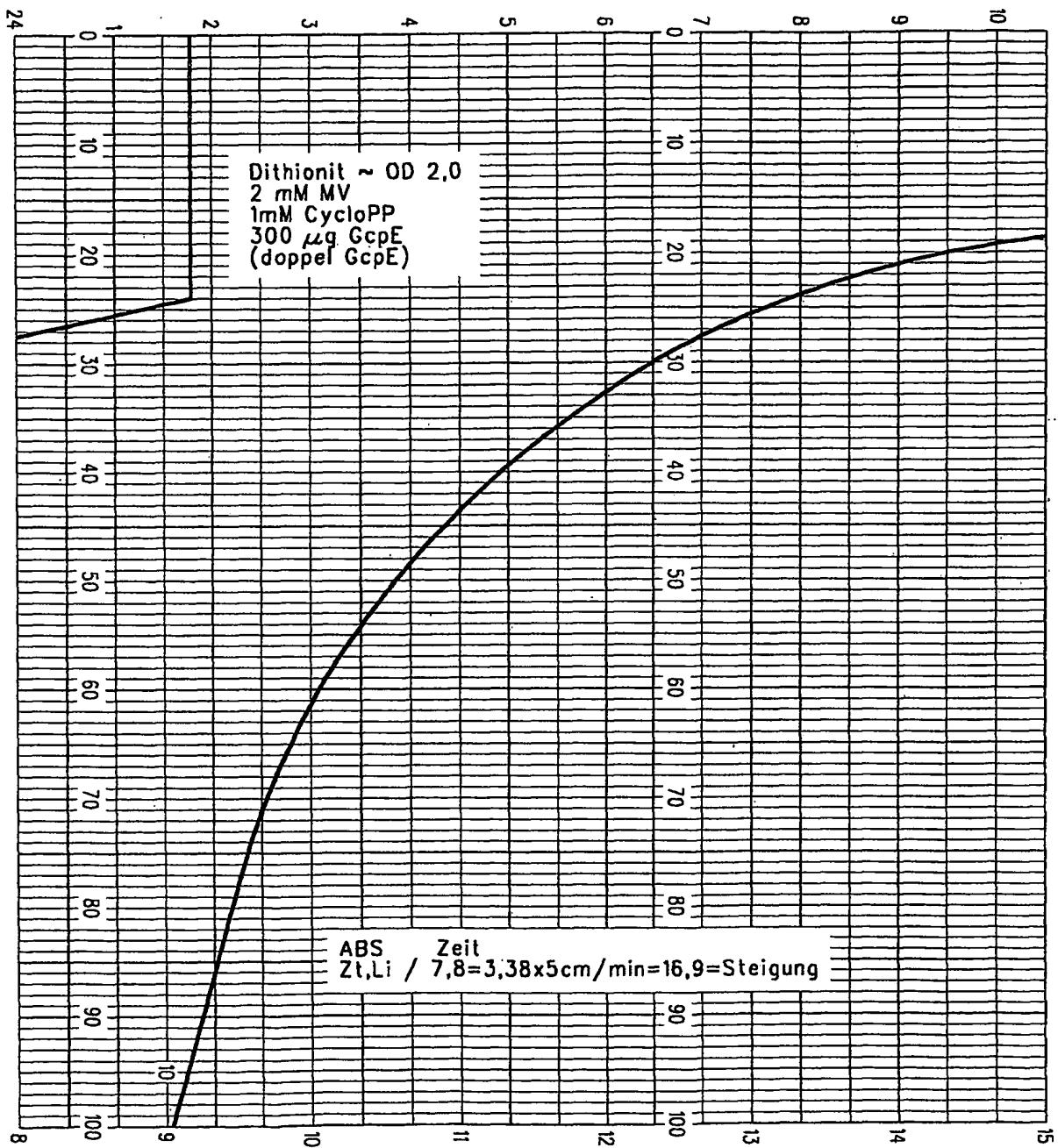


Fig. 2

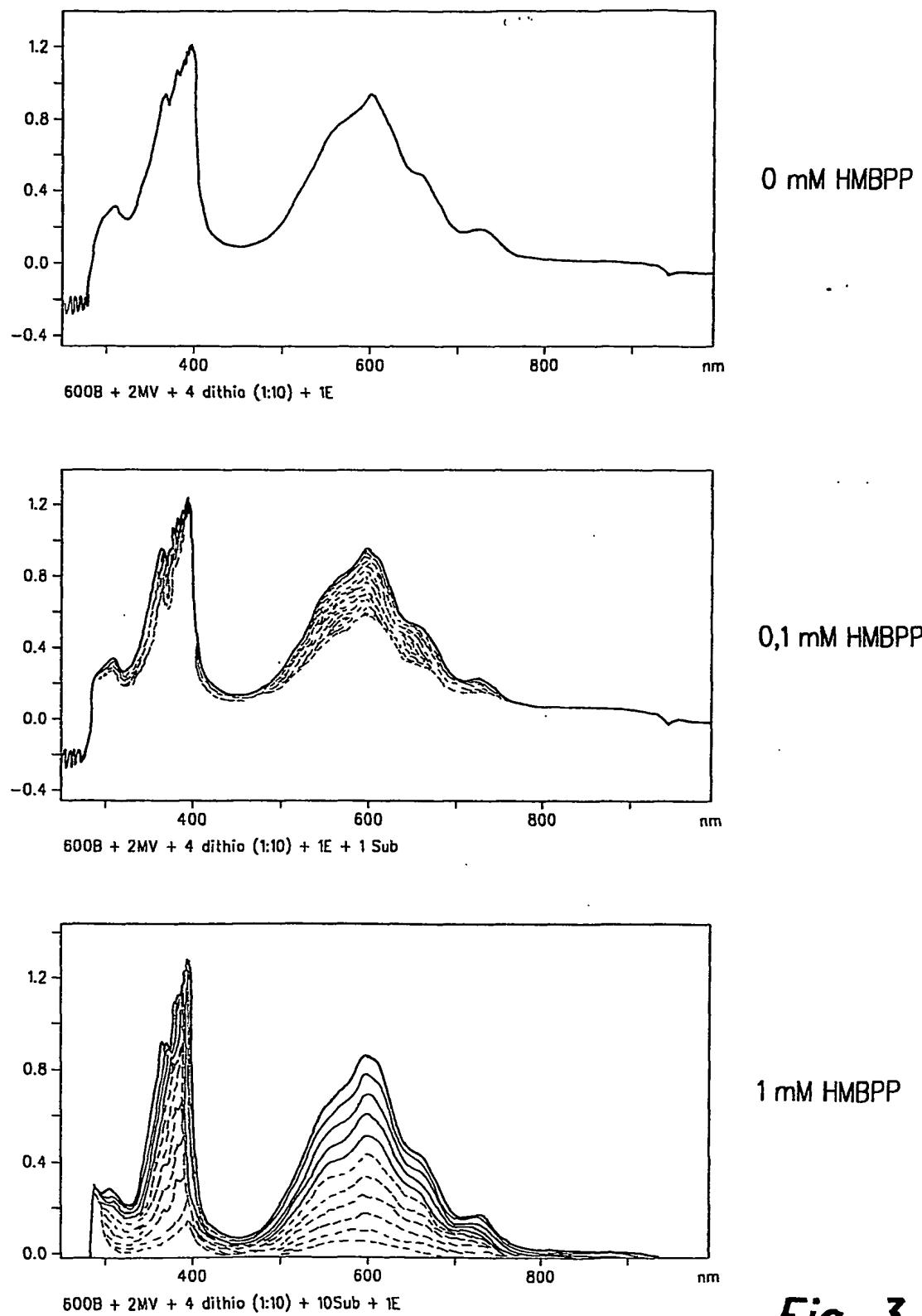


Fig. 3

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
29. April 2004 (29.04.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/035810 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/00**
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/010900
- (22) Internationales Anmeldedatum:
2. Oktober 2003 (02.10.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
102 47 478.8 11. Oktober 2002 (11.10.2002) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **BIOAGENCY AG [DE/DE]**; Schnackenburgerallee 116a, 22525 Hamburg (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **ALTINCICEK, Boran** [DE/DE]; Helgenwald 37, 35463 Fernwald-Annerod (DE). **HINTZ, Martin** [DE/DE]; Lahnstrasse 100, 35398 Giessen (DE). **JOMAA, Hassan** [DE/DE]; Wilhelmstrasse 37, 35392 Giessen (DE). **KOLLAS, Ann-Kristin** [DE/DE]; Vor der Höhe 40, 63225 Langen (DE). **SANDERBRAND, Silke** [DE/DE]; Balanstrasse 282, 81549 München (DE). **WIESNER, Jochen** [DE/DE]; Klosterweg 4c, 35394 Giessen (DE).
- (74) Anwalt: **BULLING, Alexander**; Dreiss, Fuhlendorf, Steimle & Becker, Postfach 10 37 62, 70032 Stuttgart (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 5. August 2004

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER ENZYMATISCHEN AKTIVITÄT DES LYTB- UND GCPE-PROTEINS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DER ENZYMATISCHEN AKTIVITÄT VON PROTEINEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for determining the enzymatic activity of GcpE and LytB proteins, in particular to the use of an electron carrier like dithionite, methyl viologen, benzyl viologen or an appropriated protein for measuring a substrate reaction by photometry. The inventive method is used for identifying the inhibitors of an enzymatic activity of the GcpE and LytB proteins in the form of antibacterial, antiparasitic agents and pesticides or in the form of conductivity structures for developing similar type active agents.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität des GcpE und des LytB-Proteins. Wesentlicher Bestandteil der Erfindung ist die Verwendung eines Elektronen-Überträgers wie z.B. Dithionit, Methylviologen, Benzylviologen oder eines geeigneten Proteins, wodurch die photometrische Messung des Substratumsatzes ermöglicht wird. Das Verfahren eignet sich zur Identifizierung von Inhibitoren für die enzymatische Aktivität des GcpE und LytB-Proteins, die sich als antibakteriellen, antiparasitären und herbiziden Wirkstoffe oder als

WO 2004/035810 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/10900

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, INSPEC, COMPENDEX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SEEMANN M ET AL: "Isoprenoid biosynthesis in Escherichia coli via the methylerythritol phosphate pathway: enzymatic conversion of methylerythritol cyclodiphosphate into a phosphorylated derivative of (E)-2-methylbut-2-ene-1,4-diol" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Vol. 43, no. 8, 18 February 2002 (2002-02-18), pages 1413-1415, XP004334953 ISSN: 0040-4039 the whole document ---	1-26
Y	DE 199 23 568 A (JOMAA HASSAN) 23 November 2000 (2000-11-23) claims 1-3 ---	1-26 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 May 2004

Date of mailing of the international search report

09/06/2004

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stachowiak, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/10900

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WOLFF M ET AL: "Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway. (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate: chemical synthesis and formation from methylerythritol cyclodiphosphate by a cell-free system from <i>Escherichia coli</i>"</p> <p>TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 43, no. 14, 1 April 2002 (2002-04-01), pages 2555-2559, XP004343951</p> <p>ISSN: 0040-4039</p> <p>page 2558, paragraph 2</p> <p>---</p>	1-26
Y	<p>HECHT S ET AL: "Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: The role of the GcpE (IspG) protein"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 98, no. 26, 18 December 2001 (2001-12-18), pages 14837-14842, XP002192767</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>cited in the application abstract; figures 1-6</p> <p>---</p>	1-26
Y	<p>ROHDICH F ET AL: "Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH (LytB) protein"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 99, no. 3, 5 February 2002 (2002-02-05), pages 1158-1163, XP002192768</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>cited in the application page 1163, last paragraph; figure 1</p> <p>---</p>	1-26
A	<p>DE 100 21 688 A (JOMAA HASSAN)</p> <p>15 November 2001 (2001-11-15)</p> <p>the whole document</p> <p>---</p> <p>-/-</p>	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/10900

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	KOLLAS A-K ET AL: "Functional characterization of GcpE, an essential enzyme of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 532, no. 3, 18 November 2002 (2002-11-18), pages 432-436, XP004398445 ISSN: 0014-5793 page 433, last paragraph -page 435, last paragraph ---	1-26
P,X	ROHDICH FELIX ET AL: "The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: Studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 100, no. 4, 18 February 2003 (2003-02-18), pages 1586-1591, XP001181517 February 18, 2003 ISSN: 0027-8424 (ISSN print) the whole document ---	1-26
P,X	WOLFF M ET AL: "Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (LytB/IspH) from Escherichia coli is a '4Fe-4S' protein" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 541, no. 1-3, 24 April 2003 (2003-04-24), pages 115-120, XP004421735 ISSN: 0014-5793 page 117, paragraphs 2-4 ---	1-26
P,X	ALTINCICEK B ET AL: "LytB protein catalyzes the terminal step of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 532, no. 3, 18 December 2002 (2002-12-18), pages 437-440, XP004398446 ISSN: 0014-5793 page 438, paragraph 3 ---	1-26
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/10900

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	DE 102 01 458 A (ROHDICH FELIX; BACHER ADELBERT (DE)) 17 October 2002 (2002-10-17) claims 1-102 -----	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 03/10900

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 27 because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see supplemental sheet further information PCT/ISA/210

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP03/10900Continuation of Box I.2**Claim 27**

Claim 27 was not searched because it does not define any technical features of the claimed kit, which means that it is not at all clear what is actually being claimed. The description likewise fails to provide any information regarding the make-up of such a kit. It is therefore not possible to carry out a meaningful search in respect of the subject matter of claim 17 (PCT Article 6).

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established cannot normally be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subject matter that has not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/10900

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
DE 19923568	A 23-11-2000	DE	19923568 A1	23-11-2000
		AU	5069400 A	12-12-2000
		BR	0011289 A	26-02-2002
		CA	2374608 A1	30-11-2000
		CN	1351715 T	29-05-2002
		WO	0072022 A1	30-11-2000
		EP	1179187 A1	13-02-2002
		HU	0201386 A2	28-08-2002
		JP	2003500073 T	07-01-2003
		NO	20015657 A	17-01-2002
		PL	351756 A1	16-06-2003
		TR	200103326 T2	22-04-2002
DE 10021688	A 15-11-2001	DE	10021688 A1	15-11-2001
		AU	5042801 A	20-11-2001
		CA	2407955 A1	15-11-2001
		WO	0185950 A2	15-11-2001
		EP	1337646 A2	27-08-2003
		JP	2003532422 T	05-11-2003
		US	2003115634 A1	19-06-2003
DE 10201458	A 17-10-2002	DE	10201458 A1	17-10-2002
		CA	2443874 A1	24-10-2002
		WO	02083720 A2	24-10-2002
		EP	1377663 A2	07-01-2004

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/10900

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12Q1/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, INSPEC, COMPENDEX

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SEEMANN M ET AL: "Isoprenoid biosynthesis in Escherichia coli via the methylerythritol phosphate pathway: enzymatic conversion of methylerythritol cyclodiphosphate into a phosphorylated derivative of (E)-2-methylbut-2-ene-1,4-diol" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 43, Nr. 8, 18. Februar 2002 (2002-02-18), Seiten 1413-1415, XP004334953 ISSN: 0040-4039 das ganze Dokument	1-26
Y	DE 199 23 568 A (JOMAA HASSAN) 23. November 2000 (2000-11-23) Ansprüche 1-3	1-26
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

27. Mai 2004

09/06/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Stachowiak, O

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/10900

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>WOLFF M ET AL: "Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway. (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate: chemical synthesis and formation from methylerythritol cyclodiphosphate by a cell-free system from <i>Escherichia coli</i>" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 43, Nr. 14, 1. April 2002 (2002-04-01), Seiten 2555-2559, XP004343951 ISSN: 0040-4039 Seite 2558, Absatz 2 ---</p>	1-26
Y	<p>HECHT S ET AL: "Studies on the nonmevalonate pathway to terpenes: The role of the GcpE (IspG) protein" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 98, Nr. 26, 18. Dezember 2001 (2001-12-18), Seiten 14837-14842, XP002192767 ISSN: 0027-8424 in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung; Abbildungen 1-6 ---</p>	1-26
Y	<p>ROHDICH F ET AL: "Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of IspH (LytB) protein" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 99, Nr. 3, 5. Februar 2002 (2002-02-05), Seiten 1158-1163, XP002192768 ISSN: 0027-8424 in der Anmeldung erwähnt Seite 1163, letzter Absatz; Abbildung 1 ---</p>	1-26
A	<p>DE 100 21 688 A (JOMAA HASSAN) 15. November 2001 (2001-11-15) das ganze Dokument ---</p>	1-26
		-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/10900

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	KOLLAS A-K ET AL: "Functional characterization of GcpE, an essential enzyme of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 532, Nr. 3, 18. November 2002 (2002-11-18), Seiten 432-436, XP004398445 ISSN: 0014-5793 Seite 433, letzter Absatz -Seite 435, letzter Absatz ---	1-26
P,X	ROHDICH FELIX ET AL: "The deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis: Studies on the mechanisms of the reactions catalyzed by IspG and IspH protein." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 100, Nr. 4, 18. Februar 2003 (2003-02-18), Seiten 1586-1591, XP001181517 February 18, 2003 ISSN: 0027-8424 (ISSN print) das ganze Dokument ---	1-26
P,X	WOLFF M ET AL: "Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (LytB/IspH) from Escherichia coli is a '4Fe-4S' protein" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 541, Nr. 1-3, 24. April 2003 (2003-04-24), Seiten 115-120, XP004421735 ISSN: 0014-5793 Seite 117, Absätze 2-4 ---	1-26
P,X	ALTINCICEK B ET AL: "LytB protein catalyzes the terminal step of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, Bd. 532, Nr. 3, 18. Dezember 2002 (2002-12-18), Seiten 437-440, XP004398446 ISSN: 0014-5793 Seite 438, Absatz 3 ---	1-26
		-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/10900

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,Y	DE 102 01 458 A (ROHDICH FELIX; BACHER ADELBERT (DE)) 17. Oktober 2002 (2002-10-17) Ansprüche 1-102 -----	1-26

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHTInternationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/10900**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. Ansprüche Nr. 27 weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 27

Anspruch 27 wurde nicht recherchiert, da der dort beanspruchte Kit keinerlei technische Merkmale aufweist und es somit völlig unklar ist, was eigentlich beansprucht wird. Des weiteren enthält auch die Beschreibung keine Informationen bezüglich der Zusammensetzung eines derartigen Kits. Daher ist eine sinnvolle Recherche des Gegenstandes von Anspruch 27 unmöglich (Art 6 PCT).

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/10900

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19923568	A	23-11-2000	DE 19923568 A1 AU 5069400 A BR 0011289 A CA 2374608 A1 CN 1351715 T WO 0072022 A1 EP 1179187 A1 HU 0201386 A2 JP 2003500073 T NO 20015657 A PL 351756 A1 TR 200103326 T2	23-11-2000 12-12-2000 26-02-2002 30-11-2000 29-05-2002 30-11-2000 13-02-2002 28-08-2002 07-01-2003 17-01-2002 16-06-2003 22-04-2002
DE 10021688	A	15-11-2001	DE 10021688 A1 AU 5042801 A CA 2407955 A1 WO 0185950 A2 EP 1337646 A2 JP 2003532422 T US 2003115634 A1	15-11-2001 20-11-2001 15-11-2001 15-11-2001 27-08-2003 05-11-2003 19-06-2003
DE 10201458	A	17-10-2002	DE 10201458 A1 CA 2443874 A1 WO 02083720 A2 EP 1377663 A2	17-10-2002 24-10-2002 24-10-2002 07-01-2004

This Page Blank (uspto)